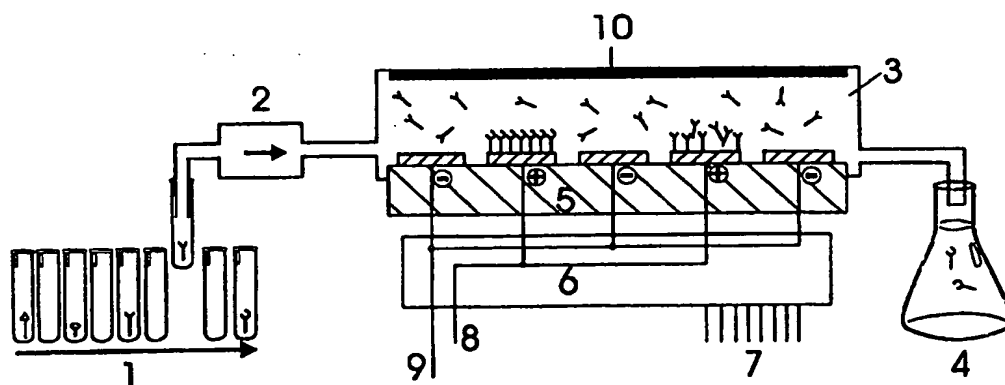


(51) Internationale Patentklassifikation ⁶: G01N 27/327, 33/543, C12Q 1/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/27355 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Juni 1999 (03.06.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03437 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. November 1998 (20.11.98) (30) Prioritätsdaten: 197 51 658.0 21. November 1997 (21.11.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): WOLF-BEIS, Otto, Samuel [AT/DE]; Ludwig-Thoma-Strasse 35/127, D-93051 Regensburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MIRSKY, Vladimir, M. [RU/DE]; Wieshuberstrasse 3, D-93059 Regensburg (DE). RIEPL, Michael [DE/DE]; Oberhaselbach 38, D-84066 Mallersdorf (DE). (74) Anwalt: LINDNER, Manfred, K.; Gottfried-Böhm-Ring 25, D-81369 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING LATERALLY ORGANIZED STRUCTURES ON SUPPORTING SURFACES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BILDUNG LATERAL ORGANISierter STRUKTUREN AUF TRÄGEROBERFLÄCHEN



(57) Abstract

The invention relates to a configuration on whose supporting surface molecular layers are immobilized in an electrically addressable manner and to a method for electrically addressable immobilization of molecules. The invention also relates to a device for carrying out this method and to the utilization of this configuration as a chemosensor and/or biosensor, especially as a multisensor system for chemical, biological and physical determinations and for applications in the combinatorial synthesis on the boundary surface.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anordnung, auf deren Trägeroberfläche molekulare Schichten elektrisch adressierbar immobilisiert sind, ein Verfahren zur elektrisch adressierbaren Immobilisierung von Molekülen, eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens und die Verwendung dieser Anordnung als Chemo- und/oder Biosensor, insbesondere als Multisensorsystem für chemische, biologische und physikalische Bestimmungen und für Anwendungen in der kombinatorischen Synthese an der Grenzfläche.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Bildung lateral organisierter Strukturen auf Trägeroberflächen

5

Beschreibung

10 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anordnung, auf deren Trägeroberfläche molekulare Schichten elektrisch adressierbar immobilisiert sind, ein Verfahren zur elektrisch adressierbaren Immobilisierung von Molekülen, eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens und die Verwendung dieser Anordnung als Chemo- und/oder Biosensor, insbesondere als Multisensorsystem für chemische, biologische und physikalische
15 Bestimmungen und für Anwendungen in der kombinatorischen Synthese an der Grenzfläche.

Sowohl Chemsensoren als auch Biosensoren, d.h. vergleichsweise kleine Meßanordnungen, werden immer häufiger benötigt, um chemische oder biochemische Analysen rasch und am Ort des Geschehens durchzuführen. Sie sind insbesondere den immunologischen
20 Nachweissystemen im Vorteil, da sie in der Lage sind, beispielsweise Konzentrationen von (bio)chemischen Stoffen in kurzer Zeit und ohne aufwendige Probenvorbereitung, vorzugsweise kontinuierlich zu erfassen. Ein Biosensor sollte deshalb klein sein, wodurch ein weiterer Vorteil der Anwendung durch die Nähe zum Ort der Untersuchung gegeben ist, z.B. können Diabetiker ihren Blutzuckerspiegel mit Hilfe enzymatischer Biosensoren in wenigen
25 Minuten bestimmen.

Chemo- bzw. Biosensorik bedeutet also sowohl erkennen als auch quantifizieren. Der Prozeß der molekularen Erkennung spielt z.B. in der Biologie eine entscheidende Rolle. Ein Zelle muß beispielsweise das Kaliumion erkennen und darf es nicht mit dem sehr ähnlichen
30 Natriumion verwechseln, das Enzym Glucosedehydrogenase darf nur Glucose abbauen, aber nicht Fructose und das Immunsystem muß eingedrungene Feinde als solche erkennen, bevor

es sie angreift. Für die Entwicklung von Chemo- und Biosensoren braucht man also Moleküle, die das Ziel erkennen. Gleichzeitig müssen die vielen anderen ebenfalls vorhandenen Stoffe ignoriert werden. Ein Biosensor muß also die Voraussetzung erfüllen, daß der Vorgang der Erkennung/Bindung nachgewiesen und in ein meßbares Signal „übersetzt“ werden kann.

5 Diese „Übersetzung“ stößt jedoch auf Schwierigkeiten, so daß ein Bedarf an einem einfach durchführbaren Nachweissystem besteht. Bei Systemen, die als Monosysteme eingesetzt werden, ist eine Immobilisierung der Moleküle nicht notwendig, da nur eine einzige Spezies erkannt und nachgewiesen werden soll. Will man jedoch multiple Systeme einsetzen, beispielsweise Multisensorsysteme mit denen verschiedene Moleküle gleichzeitig

10 nachgewiesen werden sollen, ist es erforderlich, die molekularen Schichten immobilisiert auf der Trägeroberfläche zu adressieren, damit eine Signalerkennung nachgewiesen werden kann. Ein solches System ist aus dem Stand der Technik nicht bekannt.

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren für die adressierbare

15 Immobilisierung bekannt, mit deren Hilfe mehrere verschiedene Molekültypen gezielt auf einer Trägeroberfläche gebunden werden können. Yershov et al. (Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschin, D., Drobishev, A., Dubiley, S., Mirzabekov, A., Proc. Natl. Acad. Sci. 43, (1996) 4913-4916) sowie Blanchard et al. (Blanchard, A.P., Kaiser, R.J., Hood, L.E., Biosens. & Bioelectron. 11, (1996) 687-690)

20 beschreiben die Verwendung dieser Technik beispielsweise zur Herstellung von DNA-Arrays. Darüber hinaus werden sie für die mikromechanische Adressierbarkeit und die optische Adressierbarkeit eingesetzt. Aus dem US-Patent Nr. 54 12 087 ist bekannt, daß die optische Immobilisierung durch die Verknüpfung funktioneller Gruppen mit photolabilen Schutzgruppen erfolgt. Die Aktivierung des Systems erfolgt durch Abspalten der

25 Schutzgruppe mittels Photolyse. Chrisey et al. (Chrisey, L.A., O'Ferall, E., Spargo, B.J., Dulcey, C.S., Calvert, J.M., Nucl. Acids Res. 24, (1996) 3040-3047) beschreiben eine weitere Möglichkeit, die darin besteht, daß die Adsorption unter Verwendung der Photoresist-Technik durchgeführt wird.

30 Die oben gekannten Immobilisierungsverfahren weisen jedoch viele Nachteile auf, die die Anwendbarkeit der Verfahren einschränken. So ist z.B. die Auflösung der

mikromechanischen Immobilisierung durch die Größe der einzelnen Sprühpartikel limitiert. Bei dem oben beschriebenen Verfahren von Yershov et al. (1996) und Blanchard et al. (1996) wird im besten Fall eine optische Auflösung von ca. 100 µm erreicht. Bei der optischen Immobilisierung gemäß dem US-Patent Nr. 54 12 087 muß immer mit Schutzgruppen gearbeitet werden, die die Einhaltung bestimmter Bedingungen (z.B. Lösungsmittel, Abdunklung wegen Lichtempfindlichkeit und dgl.) erfordern und die zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder abgespalten werden müssen. Die oben genannte Photorestist-Methode von Chrisey et al. (1996) ist sehr zeit- und kostenaufwendig, da eine große Anzahl von Photomasken verwendet werden muß.

10

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Anordnung bereitzustellen, die in der Lage ist, sowohl Moleküle zu binden als auch zu erkennen und damit qualitativ und quantitativ bestimmbar zu machen. Ein weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, bei der Moleküle auf einfache Weise auf Oberflächen elektrisch adressierbar immobilisiert oder desorbiert werden können, um damit die genannten Nachteile vermeiden zu können. Darüber hinaus ist es eine zusätzliche Aufgabe der Erfindung, eine neue Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens und damit zur Herstellung der erfindungsgemäßen Anordnung zu liefern.

20 Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung einer Anordnung mit elektrisch adressierbaren immobilisierten Molekülen, die einen Träger, eine und/oder mehrere (1 bis n) elektrisch leitende Trägeroberfläche(n), die auf diesem Träger angeordnet ist/sind und einen und/oder mehrere immobilisierte(n) identische und/oder verschiedene Rezeptor(en), umfaßt.

25 Obwohl bekannt ist, daß die chemische Adsorption von Molekülen auf eine Elektrode durch Veränderungen des angelegten chemischen Potentials beeinflusst werden kann und diese Potentialabhängigkeit auch für die chemische Adsorption von Thiolverbindungen auf Elektroden gilt, wurden nun die Bedingungen untersucht, bei denen beispielsweise die Gold-Schwefel-Bindung stabil ist. Überraschenderweise konnte jedoch nachgewiesen werden, daß
30 eine chemisch adsorbierte Molekularschicht auf einer Elektrode nur innerhalb eines bestimmten pH-abhängigen Potentialbereichs stabil ist. Diese Ergebnisse gehen weit über die

Erkenntnisse hinaus, die in der Literatur von Imabyashi et al. beschrieben sind (Imabyashi, S., Iida, M., Hobara, D., Feng, Z.Q., Niki, K., Kakiushi, T., J. Electroanal. Chem., 428 (1997), 33-38).

- 5 Die Lösung der Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung einer Anordnung der oben beschriebenen Art bereitzustellen, besteht darin, daß Moleküle in einfacher Art auf Oberflächen adressierbar immobilisiert werden. Dieses Verfahren besteht aus den Schritten:
- (a) ein Träger mit n Elektroden, wobei n eine ganze Zahl ist, wird in eine Durchflußzelle, in der sich Elektrolytlösung zusammen mit den zu immobilisierenden Molekülen (Rezeptoren),
10 befindet, eingebracht,
- (b) die Elektroden werden separat entweder mit einem Adsorptionspotential oder einem Desorptionspotential belegt, wobei durch das Desorptionspotential die unbeschichteten Elektrodenplätze inert gehalten werden und das an den bereits beschichteten Elektrodenplätzen weiterhin angelegte Adsorptionspotential verhindert die Desorption von
15 Molekülen ebenso wie die weitere Adsorption anders strukturierter Moleküle, wodurch erreicht wird, daß der Elektrodenplatz mit dem ersten Molekültyp besetzt ist und die Moleküle immobilisiert werden und fest an der Trägeroberfläche gebunden sind und
- (c) die Adsorption von Molekülen an der/den Elektrode(n) als Signaländerung zu messen.
- 20 Das Verfahren ist abgeschlossen, wenn ein konstanter Signalwert erreicht ist, z.B. Kapazitäts-, Impedanz- oder Resonanzfrequenzwert.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß mit der Änderung des Potentials innerhalb und außerhalb des Potentialstabilitätsbereichs die Desorption oder
25 Adsorption von Molekülen gesteuert werden kann. Mit diesem Prinzip ist es möglich, eine bestimmte laterale Struktur der chemisch adsorbierten Schicht aufzubauen.

Dieses Verfahren kann mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung durchgeführt werden, die aus einer Wechsellvorrichtung (1) für Probenbehälter,
30 einer Pumpe (2),

einer Durchflußzelle (3), in die das gewünschte Molekül oder der Rezeptor oder in die die gewünschten Moleküle oder Rezeptoren mittels der Pumpe (2) transportiert werden, einem Träger, (5) auf dem n Elektroden angeordnet sind, wobei sich der Träger (5) mit den n Elektroden in der Durchflußzelle (3) befindet,

5 einem Multiplexers (6),
einem Adreßbus (7), der den Multiplexer (6) steuert, wodurch an die Elektrode(n) separat entweder ein Adsorptionspotential (8) oder ein Desorptionspotential (9), gegenüber einer Referenzelektrode (10) angelegt wird/werden, und
einem Auffanggefäß (4), in das nach erfolgter Immobilisierung der Moleküle mittels der
10 Pumpe (2) die überschüssigen Moleküle gepumpt werden,
besteht.

Die erfindungsgemäße Anordnung wird als Chemo- und/oder Biosensor, insbesondere als Multisensorsystem verwendet.

15 Diese Verwendung wird vorteilhafterweise direkt im Probenmedium durchgeführt, so daß die Bestimmung und/oder der Nachweis in einfacher Weise durch die Messung einer Signaländerung, insbesondere Kapazität, Impedanz, Resonanzfrequenz gelingt. Damit wird ein System bereitgestellt, mit dem die oben geschilderten Probleme und Nachteile, der aus
20 dem Stand der Technik bekannten Systeme, überwunden werden.

Die erfindungsgemäßen Anordnungen mit den elektrisch adressierbar immobilisierten Molekülen können auch für die kombinatorische Synthese eingesetzt werden, indem man auf der Elektrodenoberfläche gebundene Moleküle, die je nach Elektrode identisch oder
25 verschieden sein können, durch Anlegen des Desorptionspotentials gezielt freigibt und so als Reaktionspartner während des durchgeführten Syntheseschritts zuführt oder wenn auf der Oberfläche die Synthese durchgeführt wurde, die Produkte direkt abgespalten werden können.

Für die elektrisch adressierbare Immobilisierung werden Elektroden beliebiger Größe, Form
30 und Anzahl verwendet, die auf einen Träger aus einem dielektrischen Stoff aufgebracht sind, in diesem dielektrischen Stoff können gegebenenfalls elektrische Zuleitungen für Sensorspots

eingbracht sein. Die Immobilisierung erfolgt nach den in den Figuren 1 und 2 gezeigten Schemata, die weiter unten beschrieben werden. Bei der Immobilisierung werden verschiedene Rezeptoren (Moleküle A, B, C, usw.), die eine oder mehrere Thiolgruppen enthalten, gezielt auf verschiedene Elektroden (1, 2, 3, usw.) gebunden: Rezeptor A auf Elektrode E1, Rezeptor B auf Elektrode E2, usw. Um diese Bindungen zu erreichen, wird wie folgt vorgegangen: An Elektrode E1 wird in flüssigem Elektrolyt ein geeignetes Elektrodenpotential (Adsorptionspotential) gegenüber einer Referenzelektrode angelegt, die die Bindung mit Thiolgruppen unterstützt. Gleichzeitig werden die anderen Elektroden (2, 3, usw.) mit einem Elektrodenpotential (Desorptionspotential) gegenüber derselben Referenzelektrode belegt, die ausreichend ist, um die Bindung der Thiolgruppen an diesen Elektroden zu unterdrücken. Deshalb wird das zugegebene Rezeptormolekül A nur an die Elektrode E1 gebunden. Anschließend werden die Rezeptormoleküle A in der flüssigen Elektrolyt durch eine flüssige Elektrolytlösung mit Rezeptormolekülen B ersetzt und diese Moleküle an den nachfolgenden Elektrodenplatz 2 adressiert. Durch das Anlegen des Desorptionspotential werden die unbeschichteten Elektrodenplätze weiterhin inert gehalten. Das an den bereits beschichteten Elektrodenplätzen weiterhin angelegte Adsorptionspotential verhindert die Desorption von Molekülen ebenso wie die weitere Adsorption anders strukturierter Moleküle, weil der Elektrodenplatz mit dem ersten Molekültyp vollständig besetzt ist. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis die Sensoranordnung vollständig aufgebaut ist. Zwischen dem immobilisierten Molekül und der Elektrode bildet sich eine feste Bindung. Somit ist es möglich, einen Biosensor oder ein Multisensorsystem („Array“) mit beliebiger molekularer Struktur zu erzeugen.

Ein weiterer Vorteil in dem erfindungsgemäßen Verfahren besteht darin, daß im Anschluß an die elektrisch adressierbare Immobilisierung eine oder mehrere Molekülschicht(en), z.B. Antikörper, DNA-Stränge über funktionelle Gruppen an eine beliebige Anzahl von (0 bis n) Elektroden, auf denen sich die Rezeptoren befinden, chemisch und/oder physikalisch adsorbiert und/oder immobilisiert werden kann/können. Zu diesem Zweck wird für alle beschichteten Elektroden das Adsorptionspotential beibehalten und die flüssige Elektrolytlösung der zu koppelnden Moleküle gleichzeitig mit einem Kopplungsreagenz in die Durchflußzelle gepumpt. Alternativ dazu kann auch zuerst das Kopplungsreagenz zugegeben

werden und nach erfolgter Aktivierung der Basisschicht(en) die zu koppelnden Moleküle zugegeben werden. Wenn die Moleküle in der Lage sind, selbständig an die adressierte Schicht zu binden, kann auf das Kopplungsreagenz verzichtet werden, z.B. beim Avidin-Biotin-System, Ni-His-tag, hydrophoben-hydrophoben Wechselwirkungen von Liposomen mit unfunktionalisierten Alkanthiolketten. Nach erfolgter chemischer oder physikalischer Bindung mit der/den Basisschichten wird mit flüssigem Elektrolyt gespült, um nicht verbrauchtes oder deaktiviertes Kopplungsreagenz und/oder nicht gekoppelte Moleküle aus der Zelle zu entfernen. Dieser Vorgang kann je nach Einsatzgebiet des Detektorsystems mehrmals wiederholt werden, bis schrittweise die gewünschte Sensorstruktur erreicht wird.

Analog zu dieser Anwendung können zwei oder mehrere Elektroden des Multisensorsystems („Arrays“) mit Hilfe des Adsorptionspotentials beschichtet werden und gegebenenfalls mit einer anschließenden physikalischen oder chemischen Adsorption oder Kopplung mit einer oder mehreren identischen oder verschiedenen Molekülschichten modifiziert werden. Legt man nun an bestimmten Elektroden das Desorptionspotential an, kann/können nach Desorption und Auswaschen der desorbierten Moleküle eine andere Beschichtung dieser Elektroden, nach dem oben beschriebenen Verfahren, vorgenommen werden. Dieser Vorgang kann solange wiederholt werden, bis die gewünschte Multisensoranordnung hergestellt ist.

Als Kopplungsreagentien eignen sich insbesondere Carbodiimide und deren Derivate sowie N-Succinimide und deren Derivate.

Mit den oben beschriebenen Systemen ist es möglich, in einem Nachweisverfahren verschiedene Test auf einmal durchzuführen und so eine Möglichkeit zu schaffen, die bisher durchgeführten langwierigen Einzelnachweise zu umgehen.

Als Träger eignet sich jedes feste dielektrische Substrat, insbesondere Silizium, Glas, nichtleitender Kunststoff, wie Teflon, PVC, PE, sowie leitendes oder halbleitendes Substrat, das durch eine dielektrische Schicht von der/den Elektrode(n) isoliert ist.

Als Elektroden werden dünne leitende Materialien verwendet, die fest an den Träger gebunden sind. Es eignen sich insbesondere Au, Pd, Pt, Ag, Legierungen, wie Au/Pd, Au/Ag, Ag/Pd, GaAs, und dergleichen, dotierte Halbleiter und jedes andere leitende oder halbleitende anorganische oder organische Material, wie TCNQ, TTF.

5

Als Referenzelektroden werden die allgemein in der Elektrochemie verwendeten Elektroden wie Ag/AgCl usw. mit und ohne Salzbrücke verwendet.

Als Rezeptoren, die mittels dem erfindungsgemäßen Verfahren zur elektrisch adressierbaren Immobilisation an Elektroden gebunden werden, werden Moleküle verwendet, deren Bindung mit den Elektroden durch das Elektrodenpotential gesteuert werden kann. Diese Moleküle weisen mindestens eine Thiolgruppe auf oder sind mit mindestens einer Thiolgruppe gekoppelt oder weisen eine Sulfid- oder Disulfidgruppe auf. Sie werden aus der Gruppe, bestehend aus

15 HS-(CH₂)_n-X, wobei n für eine Zahl von 2 bis 24 steht ist und X für H, OH, SH, CH₃, COOH, NH₂, sowie jedes andere Molekülfragment stehen,

X-(CH₂)_n-S-S-(CH₂)_m-Y oder X-(CH₂)_n-S-(CH₂)_m-Y, wobei m, n für eine Zahl von 2 bis 24 stehen und X, Y für H, OH, SH, CH₃, COOH, NH₂, sowie jedes andere Molekülfragment stehen, insbesondere ω-Mercaptosäuren, n-Alkanthiole, wie Octanthiol, sowie Toxinen,

20 Hormonen, Hormonrezeptoren, Peptiden, Proteinen, Enzymen, Enzymsubstraten, Cofaktoren, Arzneimitteln, Lektinen, Zucker, Oligonukleotiden, DNA, RNA, Viren, Bakteriophagen, Prionen, Oligosacchariden, natürlichen und künstlichen Rezeptoren, redox-aktiven Substanzen, Farbstoffen, Säuren, Basen, Epitopen, Antigenen oder Antikörpern, die mindestens eine Thiolgruppe aufweisen oder mit mindestens einer thiolhaltigen Verbindung

25 gekoppelt sind, ausgewählt. Ebenso können diese Rezeptoren Sulfid- oder Disulfidgruppen aufweisen. Die Thiolgruppen können in derartigen Molekülen entweder schon ursprünglich vorhanden sein oder aber erst durch chemische Modifikation eingeführt werden. Darüber hinaus kann in allen oben genannten Verbindungen das S-Atom der Thiolgruppe durch ein Se-Atom ersetzt sein.

30

Die Moleküle, die zusätzlich auf den Rezeptoren angeordnet sein können, werden ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Toxinen, Hormonen, Hormonrezeptoren, Peptiden, Proteinen, Enzymen, Enzymsubstraten, Cofaktoren, Arzneimitteln, Lektinen, Zucker, Oligonukleotiden, DNA, RNA, Viren, Bakteriophagen, Prionen, Oligosacchariden, natürlichen und künstlichen
5 Rezeptoren, redox-aktiven Substanzen, Farbstoffen, Säuren, Basen, Epitopen, Antigene oder Antikörpern, die mindestens eine funktionelle Gruppe aufweisen oder in der Lage sind, mit dem adsorbierten Rezeptor Wechselwirkungen einzugehen, wodurch sie chemisch und/oder physikalisch an der/den Elektrode(n) adsorbiert und/oder immobilisiert werden können.

10 Unter einem Adsorptionspotential versteht man ein elektrisches Potential, bei dem die Bindung der Elektrode mit dem Molekül unterstützt und/oder aufrechterhalten wird. Für die Adsorption von Thiolen an Elektroden liegt das Adsorptionspotential bei pH-Werten innerhalb eines Bereichs von 4,0 bis 8,0 im Bereich von 0 mV bis +600 mV gegenüber der Ag/AgCl-Elektrode in 100 mM KCl, vorzugsweise bei ca. +300 mV. Bei alkalischem pH wird
15 dieser Potentialbereich verschoben.

Unter dem Begriff Desorptionspotential versteht man ein Potential außerhalb des oben definierten Stabilitätsbereichs. Das Desorptionspotential muß ausreichend hoch sein, um die Adsorption von Molekülen, die während des Immobilisierungsverfahrens eingesetzt werden,
20 zu verhindern. Das Desorptionspotential liegt bei einem pH-Wert innerhalb eines Bereichs von 4,0 bis 8,0 im Bereich ab -300 mV oder niedriger gegenüber der Ag/AgCl-Elektrode in 100 mM KCl, vorzugsweise im Bereich von -600 mV bis -1800 mV, insbesondere im Bereich von -800 mV bis -1400 mV.

25 Als Elektrolytlösungen können alle wäßrigen Lösungen, organischen Elektrolyte sowie deren Mischungen als auch Mischung aus wäßrigen Elektrolyten und organischen Lösungsmitteln oder organischen Elektrolyten und organischen Lösungsmitteln verwendet werden.

Die im folgenden beschriebenen Figuren zeigen die erfindungsgemäße Vorrichtung und
30 Meßdaten des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Figur 1 zeigt schematisch die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zur elektrisch adressierbaren Immobilisierung.

Figur 2 zeigt die Vorgehensweise der elektrisch adressierbaren Beschichtung eines Chemo- und/oder Biosensors, insbesondere eines Multisensorsystems („Arrays“) mit n Einzelelektroden, wobei n eine ganze Zahl ist.

Figur 3 zeigt die Kapazitätserniedrigung (in Abhängigkeit von der Zeit) einer unbeschichteten Goldelektrode bei der Adsorption von 6-Mercaptohexansäure bei einem Elektrodenpotential von +300 mV gegenüber einer Ag/AgCl-Elektrode in 100 mM KCl. Durch die folgende Spülung mit Elektrolytlösung wird nur ein geringer Teil des adsorbierten Thiols wieder entfernt.

Figur 4 zeigt die Kapazitätsänderungen einer unbeschichteten Goldelektrode bei mehreren Zyklen der Adsorption/Desorption von Octanthiol bei einem Elektrodenpotential von -1400 mV gegenüber einer Ag/AgCl-Elektrode in 100 mM KCl. Eine abschließende Spülung entfernt das adsorbierte Thiol vollständig.

Figur 5 zeigt die Kapazitätsänderung einer unbeschichteten Goldelektrode, an die nacheinander das Desorptions- (-1400 mV) und Adsorptionspotential (+300 mV) gegenüber einer Ag/AgCl-Elektrode in 100 mM KCl angelegt wurde. Bei beiden Potentialen wurde die Adsorption von 6-Mercaptohexansäure verfolgt.

Figur 6 zeigt die Kapazitätsänderungen einer Anordnung bestehend aus zwei Goldelektroden, bei der die elektrisch adressierbare Immobilisierung von 6-Mercaptohexansäure und Octanthiol bei Elektrodenpotentialen von +300 mV bzw. -1400 mV gegenüber einer Ag/AgCl-Elektrode in 100 mM KCl durchgeführt wurde.

Figur 7 zeigt die Kapazitätsänderung von HSA-Immunsensoren bei Zugabe des Antigens, wobei jeder Symboltyp einen Sensor darstellt.

Die in Figur 1 gezeigte Vorrichtung besteht aus einer Wechsellvorrichtung (1) für Probenbehälter und einer Pumpe (2), die die gewünschten Moleküle oder Rezeptoren in die Durchflußzelle (3) transportiert. In der Durchflußzelle (3), in der sich eine Elektrolytlösung befindet, sind n Elektroden auf einem Träger (5) angeordnet. An diesen Elektroden wird separat entweder ein Adsorptionspotential (8) oder ein Desorptionspotential (9) mittels eines Multiplexers (6), der durch einen Adreßbus (7) gesteuert wird, gegenüber einer Referenzelektrode (10) angelegt. Nach erfolgter Immobilisierung werden mittels der Pumpe (2) die überschüssigen Moleküle in ein Auffanggefäß (4) gepumpt.

In Figur 2 sind detailliert die Einzelschritte der elektrisch adressierbaren Immobilisierung von x Molekülen auf n Elektroden dargestellt. In dieser Figur stellt (11) die Zugabe eines thiolhaltigen Moleküls, (12) die Adsorption dieses Moleküls und (13) die Spülung mit Elektrolytlösung dar. Über die Pumpe (2) wird Molekül A in die Zelle (3) transportiert. Dort adsorbiert das Molekül A auf die Elektrode E1, an die das Adsorptionspotential angelegt ist. Gleichzeitig wird die chemische Adsorption auf die Elektroden E2 bis En durch das dort angelegte Desorptionspotential verhindert. Die Adsorption wird mittels Kapazitätsmessungen verfolgt. Stellt sich ein konstanter Kapazitätswert für die E1 ein, ist die Adsorption von Molekül A abgeschlossen und die Zelle kann mit Elektrolytlösung gespült werden. Nach dem Auswaschen von Molekül A werden die Elektrodenpotentiale in der Weise geändert, daß an E1 das Adsorptionspotential und an den Elektroden E3 bis En das Desorptionspotential beibehalten wird. Bei Elektrode E2 verändert man das elektrische Potential unter Anlegen des Adsorptionspotentials. Über die Pumpe (2) wird aus dem Wechsellvorrichtung (1) das Molekül B in die Zelle transportiert. Dort absorbiert Molekül B nur auf E2, weil E1 bereits mit Molekül A beschichtet ist und an den Elektroden E3 bis En das Desorptionspotential angelegt ist. Die Reinigung erfolgt wie oben beschrieben. Die Beschichtung der Elektroden E3 bis En mit den Molekülen C bis X wird analog zu den Elektroden E1 und E2 durchgeführt.

Die Figuren 3 bis 5 zeigen die Kapazitätsänderungen, die bei der elektrisch adressierbaren Immobilisierung mit Einzelelektroden auftreten. Mit (14) ist die Zugabe von Octanthiol, mit (16) die Zugabe von 6-Mercaptohexansäure und mit (15) das Spülen bzw. Waschen der Elektroden mit Reinstwasser und Chloroform bezeichnet. Als Elektrolyt wurde eine wäßrige

phosphatgepufferte KCl-Lösung (100 mM) von pH 6,7 verwendet. In den Figuren sind zusätzlich die spezifischen Kapazitätswerte angegeben. Die vollständige Entfernung der bei -1400 mV adsorbierten Thiole bei der Spülung zeigt, daß diese Moleküle nur physikalisch auf der Goldelektrode adsorbiert waren (Figur 4). Im Gegensatz dazu war der größte Teil der bei +300 mV adsorbierten Thiole chemisch adsorbiert und aus diesem Grund gegenüber der Spülung stabil.

Figur 6 zeigt analog das Ergebnis mit einem Zweielektrodensystem. Als Elektrolyt wurde wäßrige phosphatgepufferte KCl-Lösung (100 mM) von pH 6,7 verwendet. Die Zugabe von 6-Mercaptohexansäure (16) sowie die Spülung (15) erfolgten bei Elektrodenpotentialen von +300 mV (Adsorptionspotential) für Elektrode E1 und -1400 mV (Desorptionspotential) für Elektrode E2. Die Zugabe von Octanthiol (14) wurde bei Elektrodenpotentialen von +300 mV für beide Elektroden durchgeführt.

Die elektrisch adressierbare Immobilisierung ermöglicht den Aufbau eines Multisensorsystems, das beispielsweise in der klinischen Diagnostik oder der chemisch-biologischen Analyse, z.B. High-Throughput-Screening, eingesetzt werden kann. Durch den gezielten Aufbau von Einzelelektroden kann ein auf den Anwender abgestimmtes Ensemble hergestellt werden.

Mit diesem Multisensorsystem können u.a. Enzymaktivitäten in Elektrolytlösungen oder biologischen Flüssigkeiten, z.B. Blut, Urin und dergleichen, bestimmt werden. Beispielsweise kann die Aktivität der Phospholipase A₂ dadurch bestimmt werden, daß man eine Liposomenschicht durch hydrophobe-hydrophobe Wechselwirkungen an eine unmodifizierte Alkanthiolmonoschicht, z.B. Hexadecanthiol oder Octanthiol bindet. Ist nun Phospholipase A₂ in der Zelle vorhanden, werden die Lipide abgebaut. Dies kann durch die Erhöhung des Kapazitätssignals nachgewiesen werden.

Ein weiteres Multisensorsystem kann die Kombination verschiedener Affinitätssensoren darstellen. Beim Nachweis eines Überschusses Human Serum Albumin (HSA) im Urin, einem

Anzeichen für Mikroalbuminurie, kann man Sensoren verwenden, die wie folgt aufgebaut sind.

Nachdem zuerst ein ω -funktionalisiertes Alkanthiol, z.B. 16-Mercaptohexadecansäure, 11-Mercaptoundecansäure, 6-Mercaptohexansäure, 16-Mercaptohexadecanamin an die
5 Elektrodenoberfläche adressiert wurde, erfolgt die kovalente Kopplung von monoklonalem anti-HSA an diese Monoschicht. Diese Sensorstruktur ermöglicht die Detektion von HSA im klinisch relevanten Bereich von 1 bis 30 $\mu\text{g/ml}$ Flüssigkeit, z.B. Urin, Pufferlösung. Die Ergebnisse sind in Figur 7 dargestellt.

10

Weitere Anwendungsbeispiele der erfindungsgemäßen Anordnung sind die Verwendung als Sensoren für Bakteriophagen, als Sensoren für Antigen-Antikörper-Nachweise, als DNA-Sonden und als immobilisierte LDL-Rezeptoren.

15 Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die Ergebnisse, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Sensoren erhalten wurden und die in den Figuren 3 bis 7 dargestellt sind, zeigen, daß es gelungen ist, verschiedene Moleküle durch elektrisch adressierbare Immobilisierung gezielt auf bestimmten Elektroden zu adsorbieren und/oder zu desorbieren und/oder zu immobilisieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Elektroden in einem
20 System als Multisensor einsetzbar sind. Es ist außerdem gelungen, ein Nachweissystem bereitzustellen, mit dem sowohl quantitativ als auch qualitativ Stoffe detektiert werden können.

Die folgenden Beispiele beschreiben die Vorgehensweise und die Bedingungen zur
25 Herstellung der erfindungsgemäßen Anordnungen mit elektrisch adressierbaren immobilisierten Molekülen auf einer Elektrode.

Beispiele

30

Beschichtung von Einzelelektroden

Vorbereitung der Elektroden

Silizium-Wafer Stückchen mit einer Größe von 3,20 mm x 10,02 mm und einer Stärke von 450 µm wurden in einem allgemein üblichen Sputterprozeß mit einer Goldelektrode der Größe 1,56 mm x 1,56 mm (reaktive Oberfläche) und einer Zuleitung von 10 µm Breite und 6,65 mm Länge versehen. Die Elektrode wurde aus einer Titan- und Palladiumschicht (Haftvermittler, jeweils 50 nm dick) und einer deckenden Goldschicht (200 nm) aufgebaut. Als Kontaktstelle für das Meßsystem wurden am oberen Ende der Zuleitungen ein versilberter Draht angelötet. Die Waferplättchen wurden vor dem Reinigungsprozeß optisch mit einem Auflichtmikroskop auf Beschädigungen überprüft. Die Reinigung erfolgte in mehreren Schritten. Zuerst wurden die Wafer 30 Minuten vollständig in Chloroform getaucht. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom wurden die Wafer in eine 1:1 (v/v) Mischung aus Chloroform und Methanol getaucht und 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Analog zu dem verwendeten Chloroform kann man bei diesen Reinigungsschritten auch Ethanol (99%) und eine Mischung aus Ethanol und Methanol benutzen. Die Wafer wurden getrocknet und für 5 Minuten in eine heiße 3:1 (v/v) Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure und 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung getaucht. Bei den letzten beiden Schritten wurde darauf geachtet, daß nur die reaktive Elektrodenfläche und maximal 4,50 mm der Zuleitung in die Mischung eintauchten. Die Elektroden wurden gründlich mit Reinstwasser (Millipore: Mili.Q_{Plus}-185; 18,2 MΩ·cm⁻¹) gespült und getrocknet. Alle Glas- und Teflongeräte wurden vor ihrer Verwendung entsprechend der vorangegangenen Beschreibung sorgfältig gereinigt.

Durchführung der Messung

Die Waferplatte mit der aufgesputteten Goldelektrode wurde gemeinsam mit einer Ag/AgCl-Referenzelektrode (Oberfläche ca. 1 cm²) an einem Teflonhalter befestigt, der als Deckel für die Meßzelle (Schnappdeckelglas, 40 mm x 19 mm) diente und eine Öffnung für die Zugabe und Entnahme von Flüssigkeiten besaß. Die Zelle wurde mit Elektrolyt (100 mM KCl; pH 6,7; ca. 3 ml) soweit gefüllt, daß die reaktive Oberfläche der Goldelektrode und die Referenzelektrode (Ag/AgCl) vollständig eintauchten. Für eine gleichmäßige Durchmischung sorgte ein Magnetrührer. Ein Lock-in-Verstärker mit integriertem Sinus-Generator erzeugte

ein konstantes Sinussignal mit einer Frequenz von 20 Hz und einer Amplitude von 10 mV. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt. Der Lock-in-Verstärker wurde auch zur Registrierung des kapazitiven Stroms verwendet. Zusätzlich zu der Wechselspannung wurde eine Gleichspannung über einen Spannungsgeber zugegeben. 5 Erfolgte die Adsorption von Molekülen auf die Elektrodenoberfläche wurde dieses als Kapazitätsänderung gemessen. Das Meßsignal wurde auf einem x-t Schreiber aufgezeichnet und über einen 16 Bit A-D Umwandler in den Rechner übertragen. Zu Beginn der Messung wurde die absolute Kapazität der unbeschichteten Goldelektrode bei einem elektrischen Potential von +300 mV bestimmt. Man erhielt Werte von mindestens 12-14 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$.

10

Adsorptionspotential

Nachdem die Elektrode einen stabilen Kapazitätswert erreicht hatte, wurde das Adsorptionspotential (+300 mV) beibehalten und soviel 6-Mercaptohexansäure in Elektrolyt 15 gelöst zugegeben, das in der Meßzelle eine Konzentration von 50 $\mu\text{mol}/\text{l}$ vorlag. Die Adsorption setzte sofort ein und war nach ca. 2,5 Stunden abgeschlossen (vergleiche Figur 3). Die Halbwertszeit der Beschichtung betrug ca. 10 Minuten und der absolute Kapazitätswert war mit 4,3 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ vergleichbar mit dem einer in Chloroform oder Ethanol (1 mM 6-Mercaptohexansäure) beschichteten Goldelektrode. Nach dieser Beschichtung wurde die 20 Meßzelle geöffnet, die Goldelektroden mit Reinstwasser gespült und ca. 5 Sekunden in Chloroform getaucht, um physikalisch adsorbiertes Thiol von den Elektroden zu entfernen. Die Referenzelektrode, die Meßzelle und der Rührer wurden gründlich mit Reinstwasser, Chloroform, Ethanol und Aceton gereinigt, um 6-Mercaptohexansäure zu entfernen. Anschließend wurde die Qualität der Beschichtung durch erneute Messung der Kapazität 25 überprüft. Es wurde nur eine geringfügige Kapazitätserhöhung (1-2%) gegenüber den zuvor erhaltenen Werten gemessen.

Desorptionspotential

30 An die Goldelektrode wurde ein Desorptionspotential von -1400 mV angelegt und die Stabilität des Kapazitätswerts abgewartet. Anschließend wurde soviel Octanthiol zugegeben,

daß in der Zelle eine Konzentration von 250 µmol/l vorlag. Die folgende Kapazitätserniedrigung betrug nach 2 Stunden ca. 30% bei einer Halbwertszeit von 45 Minuten (vergleiche Figur 4). Der absolute Kapazitätswert war mit 7,8 µF/cm² deutlich größer als bei der Goldelektrode, die unter Anlegen des Adsorptionspotentials beschichtet worden war. Nach der Reinigung der Elektrode mit Reinstwasser und Chloroform (5 Sekunden) zeigte sich, daß die Kapazitätserniedrigung nur auf physikalisch adsorbiertes Thiol zurückzuführen war, weil die Startwerte von 12-14 µF/cm² wieder erreicht wurden. Die physikalische Adsorption und der darauf folgende Reinigungsschritt wurden mehrmals wiederholt und lieferten stets das gleiche Ergebnis.

Desorptions-/Adsorptionspotential

An die Goldelektrode wurde ein Desorptionspotential von -1400 mV angelegt und die Einstellung eines stabilen Kapazitätswertes abgewartet. Anschließend wurde soviel 6-Mercaptohexansäure in Elektrolyt gelöst zugegeben, daß in der Meßzelle eine Konzentration von 50 µmol/l vorlag. Die Kapazitätserniedrigung betrug nach 1 Stunde ca. 7% (vergleiche Figur 5). Das angelegte Desorptionspotential wurde jetzt durch das Adsorptionspotential (+300 mV) ersetzt. Die Kapazitätserniedrigung, die durch die Potentialänderung verursacht wurde, wurde von der sofort beginnenden Adsorption überlagert und konnte nicht bestimmt werden. Nach ca. 2 Stunden war die Adsorption abgeschlossen (Halbwertszeit 8 Minuten) und die absolute Kapazität (4,9 µF/cm²) mit einer in organischer Lösung beschichteten Goldelektrode vergleichbar. Durch die Reinigung der Elektrode mit Reinstwasser und Ethanol (10 Sekunden) wurde kein adsorbiertes Thiol mehr entfernt.

Beschichtung eines Multisensorsystems

Vorbereitung der Elektroden

Silizium-Wafer Stückchen mit einer Größe von 3,20 mm x 10,02 mm und einer Stärke von 450 µm wurden in einem allgemein üblichen Sputterprozeß mit zwei Goldelektroden der Größe 1,56 mm x 1,56 mm (reaktive Oberfläche) und einer Zuleitung von 10 µm Breite und

6,65 mm Länge versehen. Die Elektrode wurde aus einer Titan- und Palladiumschicht (Haftvermittler, jeweils 50 nm dick) und einer deckenden Goldschicht (200 nm) aufgebaut. Der Abstand der Elektroden voneinander betrug 1,56 mm. Das Anbringen der Kontaktstelle und der Reinigungsprozeß wurden analog dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt.

5

Messung

Die Waferplatte mit den zwei Goldelektroden wurde gemeinsam mit einer Ag/AgCl-Referenzelektrode (Oberfläche ca. 1 cm^2) an einem Teflonhalter befestigt, der als Deckel für die Meßzelle (ein Schnappdeckelglas, 40 mm x 19 mm) diente und eine Öffnung für die Zugabe und Entnahme von Flüssigkeiten besaß. Die Zelle wurde mit Elektrolyt (100 mM KCl; pH 6,7; ca. 3 ml) soweit gefüllt, daß die reaktive Oberfläche der Goldelektroden und die Referenzelektrode (Ag/AgCl) vollständig eintauchten. Für eine gleichmäßige Durchmischung sorgte ein Magnetrührer. Ein Lock-in-Verstärker mit integriertem Sinus-Generator erzeugte ein konstantes Sinussignal mit einer Frequenz von 20 Hz und einer Amplitude von 10 mV. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt. Der Lock-in-Verstärker wurde auch zur Registrierung des kapazitiven Stroms verwendet. Zusätzlich zu der Wechselspannung wurde eine Gleichspannung über einen Spannungsgeber zugegeben. Die zwei Potentialgeber ermöglichten das separate Anlegen von elektrischen Potentialen (U_1 , U_2) an die Goldelektroden (E_1 , E_2) vs. Ag/AgCl-Referenzelektrode. Die Adsorption von Molekülen auf die Elektrodenoberfläche wurde als Kapazitätsänderung gemessen. Das Meßsignal wurde auf einem x-t Schreiber aufgezeichnet und über einen 16 Bit A-D Umwandler in den Computer übertragen. Vor der Zugabe des ersten Thiols wurde die Kapazität der unbeschichteten Goldelektrode bei einem Elektrodenpotential $U_1 = U_2 = +300 \text{ mV}$ geprüft. Man erhielt Werte von mindestens $12\text{-}14 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, die typisch für unbeschichtete Goldelektroden sind.

Nachdem beide Elektroden stabile Kapazitätswerte erreicht hatten, wurde die Kapazität der Elektrode E_1 gemessen. Das an Elektrode E_2 angelegte Potential von +300 mV wurde nach -1400 mV verschoben. Es wurden Kapazitätsänderungen an Elektrode E_1 auf Grund dieser Potentialverschiebung abgewartet. Dann wurde soviel 6-Mercaptohexansäure in Elektrolyt

gelöst zugegeben, daß eine Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ in der Zelle vorlag. Die Adsorption setzte sofort ein und war nach ca. 2,5 Stunden abgeschlossen. Die Halbwertszeit der Beschichtung betrug ca. 15 Minuten und der absolute Kapazitätswert war mit 4 bis 5 $\mu\text{F/cm}^2$ vergleichbar mit dem einer in Chloroform (1 mM 6-Mercaptohexansäure) beschichteten Goldelektrode. Nach dieser Beschichtung wurde die Meßzelle geöffnet, die Goldelektroden mit Reinstwasser gespült und ca. 5 Sekunden in Chloroform getaucht, um physikalisch adsorbiertes Thiol von den Elektroden zu entfernen. Die Referenzelektrode, die Meßzelle und der Rührer wurden gründlich mit Reinstwasser, Chloroform, Ethanol und Aceton gereinigt, um 6-Mercaptohexansäure zu entfernen. Die Meßzelle wird, wie bereits oben beschrieben, aufgebaut und mit frischem Elektrolyt befüllt. Bei einem Potential von $U_1 = U_2 = +300 \text{ mV}$ wurden erneut die absoluten Kapazitätswerte gemessen. Die mit 6-Mercaptohexansäure beschichtete Elektrode *E1* hatte einen Wert von 4,2 $\mu\text{F/cm}^2$, die zweite Elektrode wurde während des zweiten Beschichtungsschrittes verfolgt. Bei Zugabe von Octanthiol (Konzentration in der Zelle 150 $\mu\text{mol/l}$) erfolgte eine sofortige Adsorption, die nach ca. 3 Stunden beendet war (Halbwertszeit 10,5 Minuten). Die absoluten Kapazitätswerte der beiden Goldelektroden betrugen nach einem erneuten Reinigungsschritt 1,4 $\mu\text{F/cm}^2$ für Elektrode *E2* und 4,1 $\mu\text{F/cm}^2$ für Elektrode *E1*.

Der Vergleich der bisher bekannten Immobilisierungsverfahren mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und der damit erhaltenen erfindungsgemäßen Anordnung zeigt, daß Chemo- und/oder Biosensoren bereitgestellt werden können, mit denen quantitative und qualitative Bestimmungen von unterschiedlichen Stoffen und Verbindungen durchgeführt werden können. Darüber hinaus gelingt der Nachweis der zu bestimmenden Substanzen in einfacher Weise über die Messung von Kapazitätsänderungen, vorzugsweise direkt im Medium.

5

Ansprüche

- 10 1. Anordnung mit elektrisch adressierbar immobilisierten Molekülen umfassend einen Träger, eine und/oder mehrere (1 bis n) elektrisch leitende Trägeroberfläche(n), die auf diesem Träger angeordnet ist/sind und einen und/oder mehrere identische und/oder verschiedene immobilisierte(n) Rezeptor(en).
- 15 2. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger aus einem festen dielektrischen Substrat besteht, die Trägeroberfläche(n) eine und/oder mehrere voneinander getrennte Elektrode(n) ist/sind, die sich auf dem Träger angeordnet sind, auf der oder denen der oder die Rezeptor(en) immobilisiert sind.
- 20 3. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial ein festes dielektrisches Substrat, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Silizium, Glas, nichtleitendem Kunststoff, insbesondere Teflon, PVC, PE, ist.
4. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in dem
25 dielektrischen Stoff elektrische Zuleitungen für Sensorspots vorhanden sind.
5. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrode(n) eine dünne Schicht aus einem leitenden oder halbleitenden Materials, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Au, Pd, Pt, Ag, Legierungen, insbesondere GaAs, Au/Pd,
30 Au/Ag, Ag/Pd, dotierten Halbleitern und anderen leitenden oder halbleitenden anorganischem oder organischem Material, ist.

6. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der/die Rezeptor(en), der/die immobilisiert wird/werden, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$, wobei n für eine Zahl von 2 bis 24 steht ist und X für H, OH, SH, CH_3 , COOH, NH_2 , sowie jedes andere Molekülfragment stehen,
5 $\text{X}-(\text{CH}_2)_n\text{-S-S}-(\text{CH}_2)_m\text{-Y}$ oder $\text{X}-(\text{CH}_2)_n\text{-S}-(\text{CH}_2)_m\text{-Y}$, wobei m, n für eine Zahl von 2 bis 24 stehen und X, Y für H, OH, SH, CH_3 , COOH, NH_2 , sowie jedes andere Molekülfragment stehen, insbesondere ω -Mercaptosäuren, n-Alkanthiole, wie Octanthiol, sowie Toxinen, Hormonen, Hormonrezeptoren, Peptiden, Proteinen, Enzymen, Enzymsubstraten, Cofaktoren,
10 Arzneimitteln, Lektinen, Zucker, Oligonukleotiden, DNA, RNA, Viren, Bakteriophagen, Prionen, Oligosacchariden, natürlichen und künstlichen Rezeptoren, redox-aktiven Substanzen, Farbstoffen, Säuren, Basen, Epitopen, Antigene oder Antikörpern, die mindestens eine Thiolgruppe oder eine Sulfid- oder Disulfidgruppe aufweisen oder mit mindestens einer thiolhaltigen Verbindung gekoppelt ist/sind.
- 15 7. Anordnung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Thiolgruppe durch eine Selenolgruppe ersetzt ist.
8. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden
20 auf demselben oder auf separaten Trägern angeordnet sind.
9. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß auf die elektrisch adressierbare immobilisierte Schicht eine oder mehrere Molekülschicht(en) chemisch und/oder physikalisch über eine funktionelle Gruppe oder über Wechselwirkungen
25 adsorbiert und/oder immobilisiert ist/sind, wobei die Molekülschichten ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus Toxinen, Hormonen, Hormonrezeptoren, Peptiden, Proteinen, Enzymen, Enzymsubstraten, Cofaktoren, Arzneimitteln, Lektinen, Zucker, Oligonukleotiden, DNA, RNA, Viren, Bakteriophagen, Prionen, Oligosacchariden, natürlichen und künstlichen Rezeptoren, redox-aktiven Substanzen, Farbstoffen, Säuren, Basen, Epitopen, Antigene oder
30 Antikörpern.

10. Verfahren zur elektrisch adressierbaren Immobilisierung von Molekülen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bestehend aus den Schritten:

- (a) ein Träger mit n Elektroden, wobei n eine ganze Zahl ist, wird in eine Durchflußzelle, in der sich Elektrolytlösung zusammen mit den zu immobilisierenden Molekülen (Rezeptoren) befindet, eingebracht,
- (b) die Elektroden werden separat entweder mit einem Adsorptionspotential oder einem Desorptionspotential belegt, wobei durch das Desorptionspotential die unbeschichteten Elektrodenplätze inert gehalten werden und das an den bereits beschichteten Elektrodenplätzen weiterhin angelegte Adsorptionspotential verhindert die Desorption von Molekülen ebenso wie die weitere Adsorption anders strukturierter Moleküle, wodurch erreicht wird, daß der Elektrodenplatz mit dem ersten Molekültyp besetzt ist und die Moleküle immobilisiert werden und fest an der Trägoberfläche gebunden sind und
- (c) die Adsorption von Molekülen an der/den Elektrode(n) als Signaländerung zu messen.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorgang der Immobilisierung von Molekülen solange wiederholt wird, bis auf den Elektrodenplätzen (0-n) identische und/oder verschiedene Rezeptoren gebunden sind.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß im Anschluß an die elektrisch adressierbare Immobilisierung eine oder mehrere Molekülschicht(en) an eine beliebige Anzahl von Rezeptoren, die an den Elektroden immobilisiert sind, chemisch und/oder physikalisch adsorbiert und/oder immobilisiert wird/werden, wobei für alle beschichteten Elektroden das Adsorptionspotential beibehalten wird und eine Elektrolytlösung der zu koppelnden Moleküle gleichzeitig mit einem Kopplungsreagenz in die Durchflußzelle gepumpt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß im Anschluß an die elektrisch adressierbare Immobilisierung eine oder mehrere Molekülschicht(en) an eine beliebige Anzahl von Rezeptoren, die an n Elektroden immobilisiert sind, chemisch und/oder physikalisch adsorbiert und/oder immobilisiert wird/werden, wobei für alle beschichteten Elektroden das Adsorptionspotential beibehalten

wird und zunächst ggf. durch Zugabe des Kopplungsreagenz, die Basisschicht(en) aktiviert wird/werden und anschließend die zu koppelnden Moleküle zugegeben werden.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorgang der chemischen, biologischen oder physikalischen Beschichtung so lange wiederholt wird, bis schrittweise die gewünschte Sensorstruktur erreicht ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, das die Stoffe, die zusätzlich auf die immobilisierte Schicht aufgebracht sind, ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus Toxinen, Hormonen, Hormonrezeptoren, Peptiden, Proteinen, Enzymen, Enzymsubstraten, Cofaktoren, Arzneimitteln, Lektinen, Zucker, Oligonukleotiden, DNA, RNA, Viren, Bakteriophagen, Prionen, Oligosacchariden, natürlichen und künstlichen Rezeptoren, redox-aktiven Substanzen, Farbstoffen, Säuren, Basen, Epitopen, Antigene oder Antikörpern und mindestens eine funktionelle Gruppe aufweisen oder in der Lage sind, Wechselwirkungen mit den Rezeptoren einzugehen.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Kopplungsreagenz ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus Carbodiimide und deren Derivate, N-Succinimide und deren Derivate.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Adsorptionspotential bei pH-Werten innerhalb eines Bereichs von 4,0 bis 8,0 im Bereich von 0 bis +600 mV gegenüber einer Ag/AgCl-Elektrode in 100 mM KCl, vorzugsweise bei +300 mV bei pH 7,0 liegt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Desorptionspotential bei pH-Werten innerhalb eines Bereichs von 4,0 bis 8,0 im Bereich ab -300 mV oder niedriger gegenüber der Ag/AgCl-Elektrode in 100 mM KCl, vorzugsweise im Bereich von -600 mV bis -1800 mV, insbesondere im Bereich von -800 mV bis -1400 mV liegt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial ein festes dielektrisches Substrat, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Silizium, Glas, nichtleitendem Kunststoff, insbesondere Teflon, PVC, PE, ist.
- 5 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß in dem dielektrischen Stoff elektrische Zuleitungen für Sensorspots vorhanden sind.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrode(n) eine dünne Schicht aus einem leitenden oder halbleitenden Materials, ausgewählt
10 aus der Gruppe, bestehend aus Au, Pd, Pt, Ag, Legierungen, insbesondere GaAs, Au/Pd, Au/Ag, Ag/Pd, dotierten Halbleitern und anderen leitenden oder halbleitenden anorganischem oder organischem Material, ist.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß der/die
15 Rezeptor(en), der/die immobilisiert wird/werden, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-X}$, wobei n für eine Zahl von 2 bis 24 steht ist und X für H, OH, SH, CH_3 , COOH, NH_2 , sowie jedes andere Molekülfragment stehen,
 $\text{X}-(\text{CH}_2)_n\text{-S-S}-(\text{CH}_2)_m\text{-Y}$ oder $\text{X}-(\text{CH}_2)_n\text{-S}-(\text{CH}_2)_m\text{-Y}$, wobei m, n für eine Zahl von 2 bis 24
20 stehen und X, Y für H, OH, SH, CH_3 , COOH, NH_2 , sowie jedes andere Molekülfragment
stehen, insbesondere ω -Mercaptosäuren, n-Alkanthiole, wie Octanthiol, sowie Toxinen, Hormonen, Hormonrezeptoren, Peptiden, Proteinen, Enzymen, Enzymsubstraten, Cofaktoren, Arzneimitteln, Lektinen, Zucker, Oligonukleotiden, DNA, RNA, Viren, Bakteriophagen, Prionen, Oligosacchariden, natürlichen und künstlichen Rezeptoren, redox-aktiven
25 Substanzen, Farbstoffen, Säuren, Basen, Epitopen, Antigene oder Antikörpern, die mindestens eine Thiolgruppe oder eine Sulfid- oder Disulfidgruppe aufweisen oder mit mindestens einer thiolhaltigen Verbindung gekoppelt ist/sind.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Thiolgruppe der durch eine Selenolgruppe ersetzt ist.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden auf demselben oder auf separaten Trägern angeordnet sind.

25. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens zur elektrisch adressierbaren
5 Immobilisierung von Molekülen bestehend aus
einer Wechsellvorrichtung (1) für Probenbehälter,
einer Pumpe (2),
einer Durchflußzelle (3), in die das gewünschte Molekül oder der Rezeptor oder in die die
gewünschten Moleküle oder Rezeptoren mittels der Pumpe (2) transportiert werden,
10 einem Träger (5), auf dem n Elektroden angeordnet sind, wobei sich der Träger (5) mit den
 n Elektroden in der Durchflußzelle (3) befindet
einem Multiplexers (6),
einem Adreßbus (7), der den Multiplexer (6) steuert, wodurch an die Elektrode(n)
wird/werden separat entweder ein Adsorptionspotential (8) oder ein Desorptionspotential (9),
15 gegenüber einer Referenzelektrode (10) angelegt, und
einem Auffanggefäß (4), in das nach erfolgter Immobilisierung der Moleküle mittels der
Pumpe (2) die überschüssigen Moleküle gepumpt werden.

26. Verwendung der Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 als Chemo-
20 und/oder Biosensor, insbesondere als Multisensorsystem für chemische, biologische und/oder
physikalische Bestimmungen.

27. Verwendung der Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 in der kombinatorischen
Synthese in der Grenzfläche.

25
28. Verwendung der Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 als Sensor für Antigen-
Antikörper-Nachweise, zum Nachweis von Bakteriophagen oder als DNA-Sonden.

29. Verwendung der Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur quantitativen und
30 qualitativen Bestimmung der nachzuweisenden Substanzen direkt im Probenmedium.

1/5

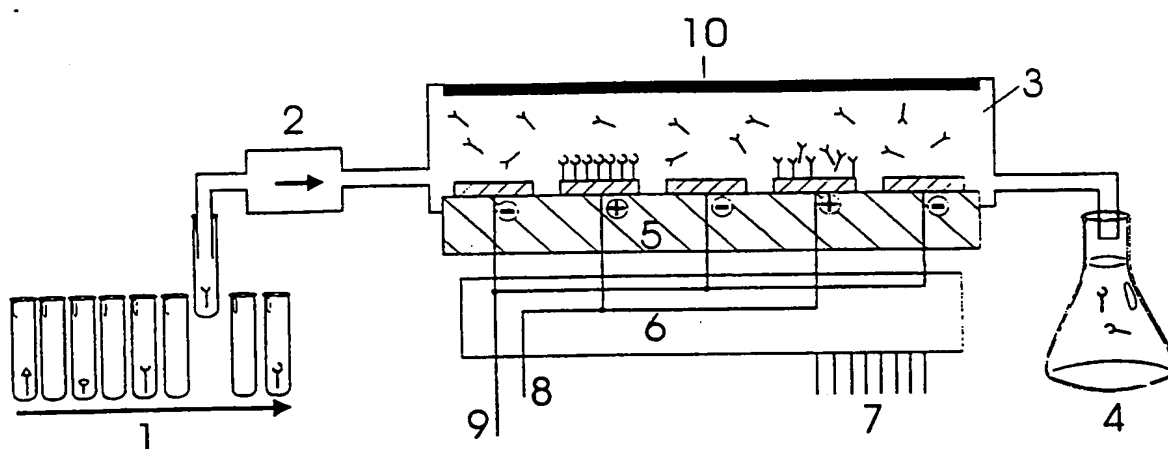
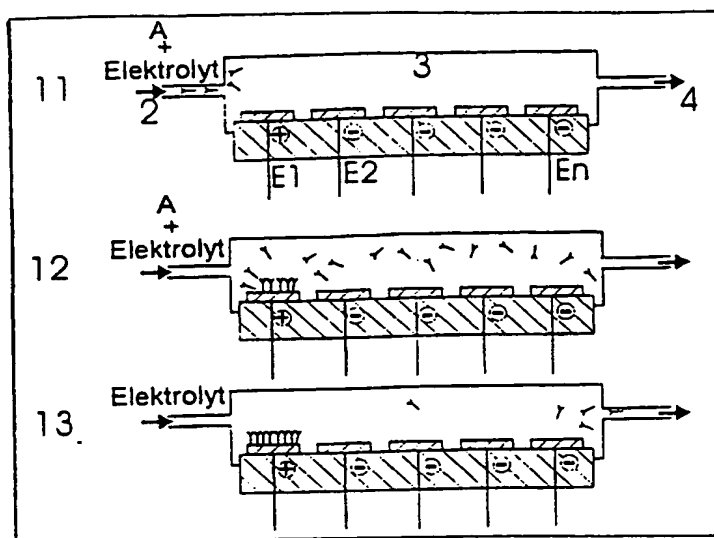


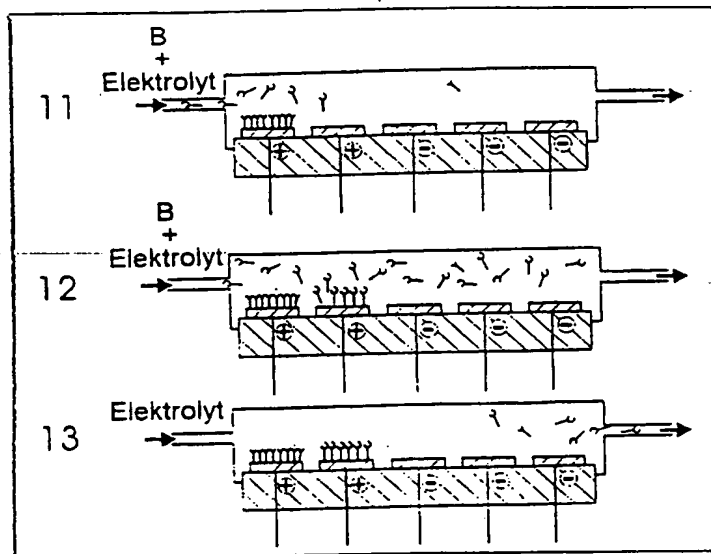
Fig. 1

2/5

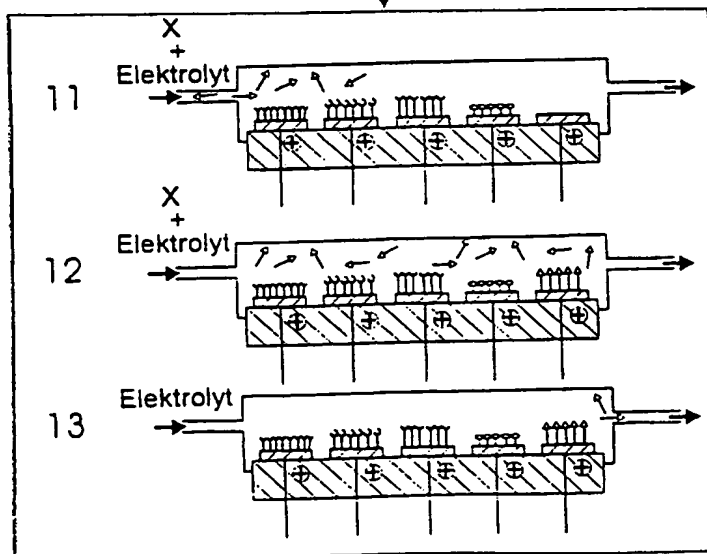


1. Zyklus

- \oplus ADSORPTIONSPOTENTIAL
- \ominus DESORPTIONSPOTENTIAL
- γ MOLEKÜLTYP A
- δ MOLEKÜLTYP B
- ...
- ϵ ...
- ζ MOLEKÜLTYP X



2. Zyklus



n. Zyklus

Fig. 2

3/5

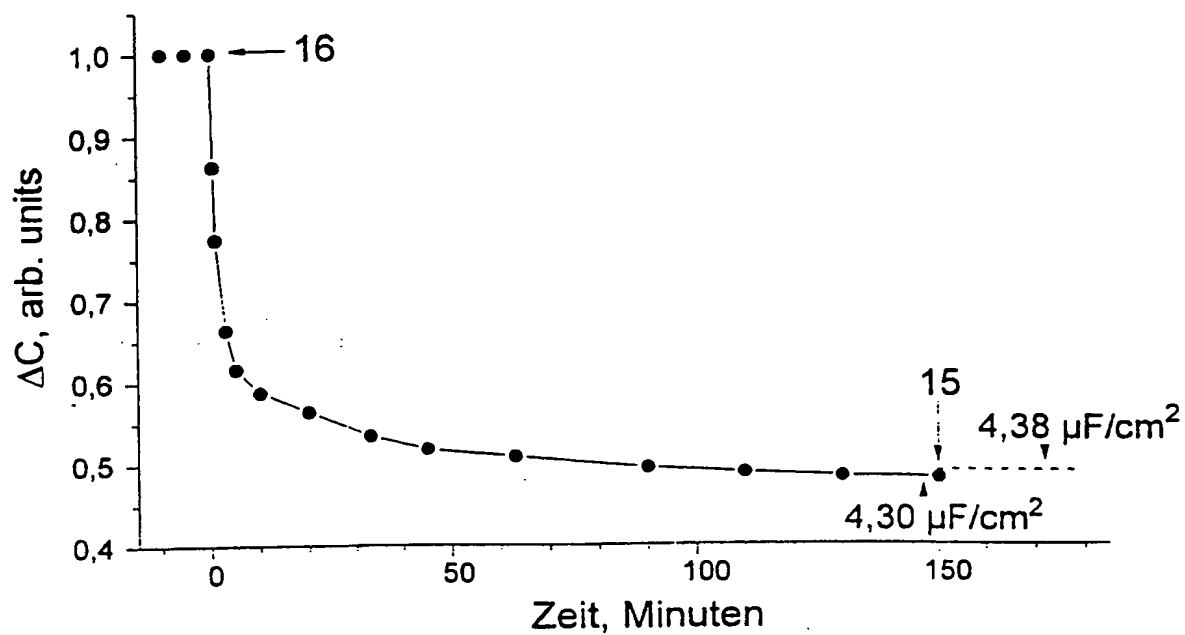


Fig. 3

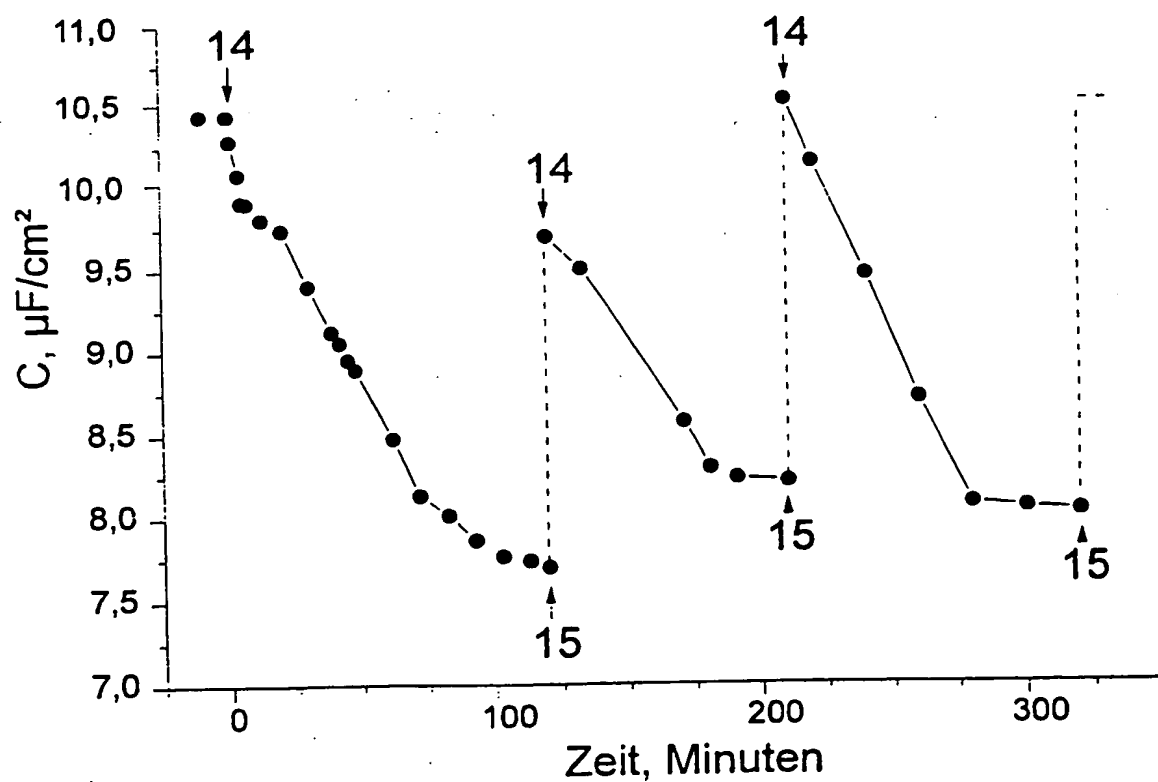


Fig. 4

4/5

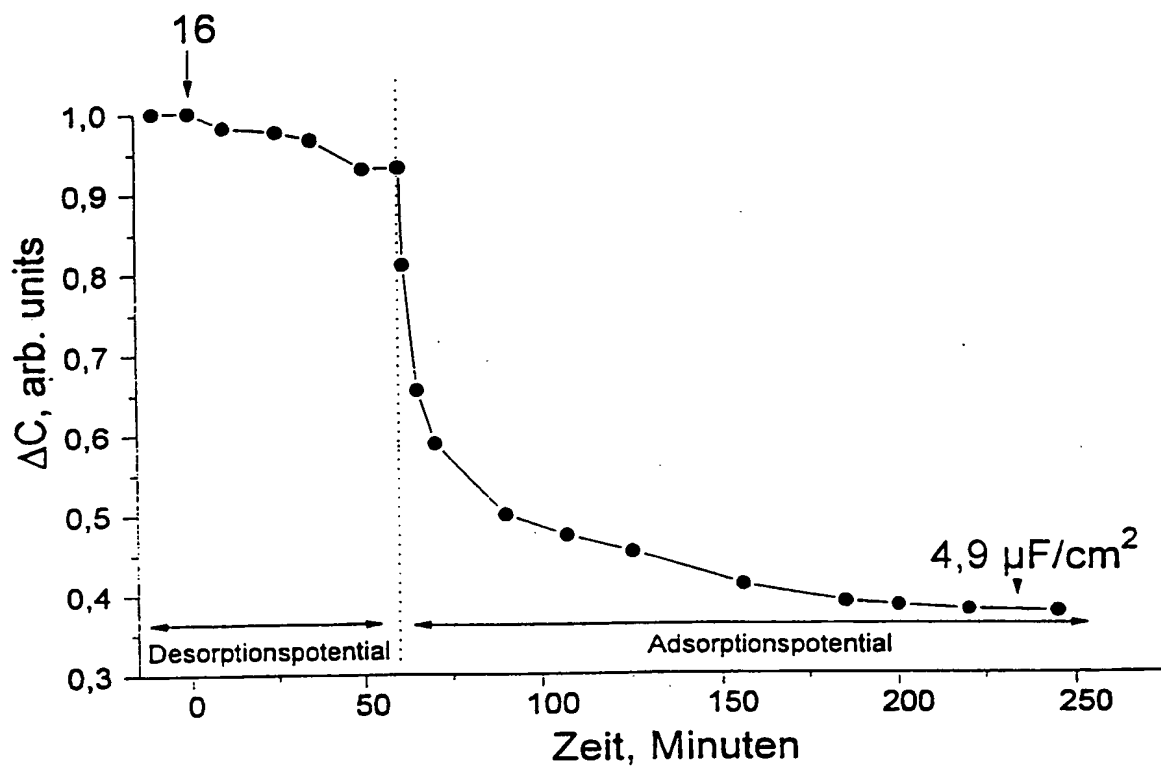


Fig. 5

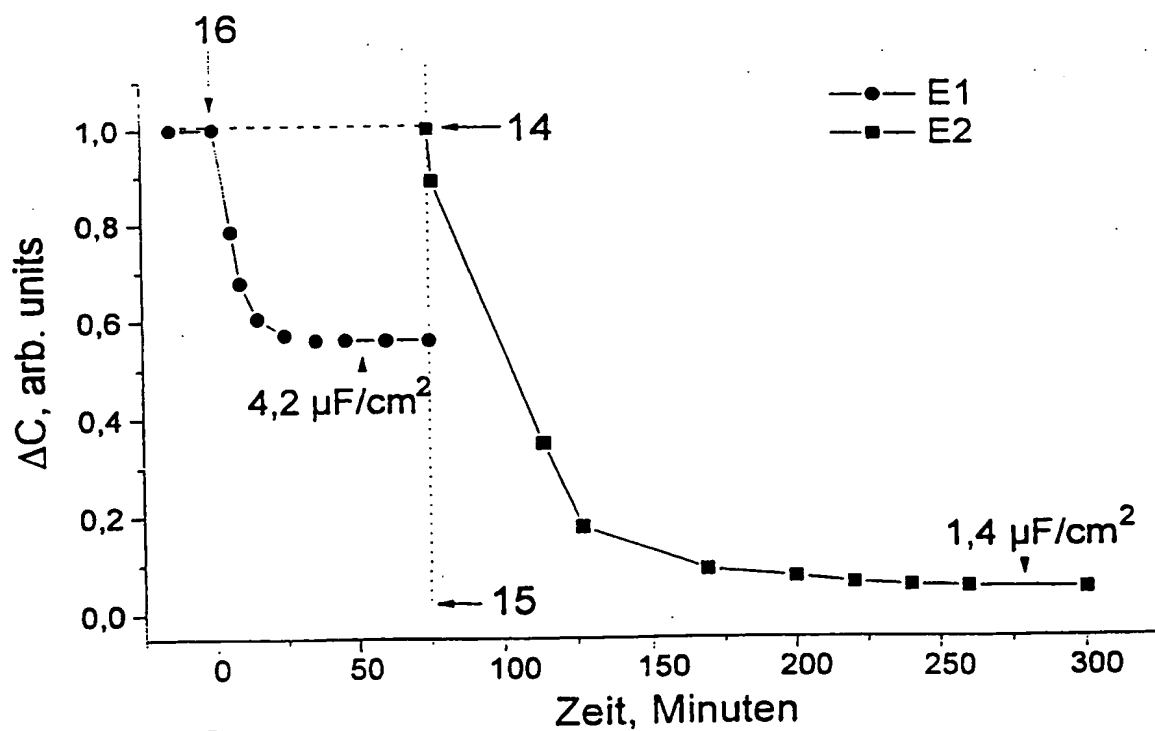


Fig. 6

5/5

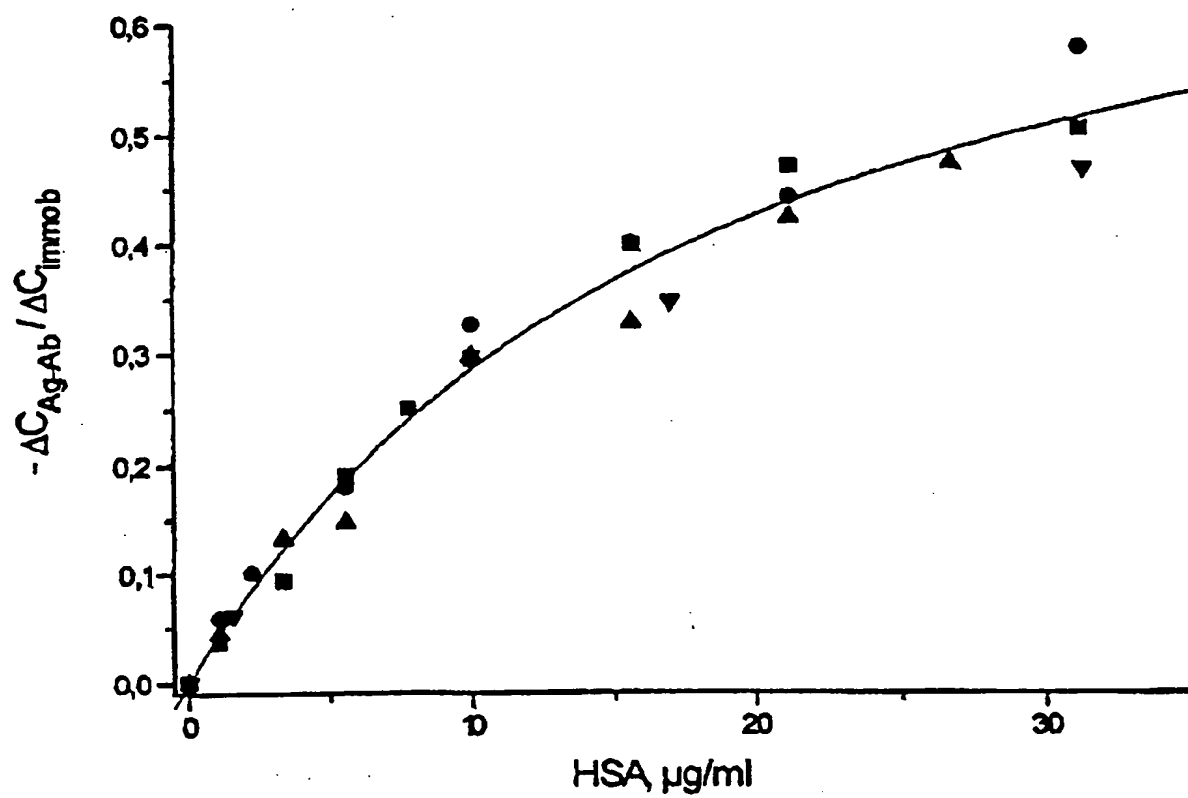


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 98/03437

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N27/327 G01N33/543 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 653 939 A (KOSICKI BERNARD B ET AL) 5 August 1997 see column 2 - column 4 ---	1,25
X	US 5 474 796 A (BRENNAN THOMAS M) 12 December 1995 see examples 1-3 ---	1,25
X	WO 96 28538 A (MESO SCALE TECHNOLOGIES LLC) 19 September 1996 see examples ---	1,25
A	EP 0 402 917 A (BIOCIRCUITS CORP) 19 December 1990 see examples -----	1,25

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 April 1999

Date of mailing of the international search report

11/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/03437

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5653939 A	05-08-1997	US 5846708 A EP 0638173 A JP 7508831 T WO 9322678 A AT 176324 T DE 69228291 D EP 0543550 A JP 5322817 A US 5532128 A US 5670322 A US 5891630 A	08-12-1998 15-02-1995 28-09-1995 11-11-1993 15-02-1999 11-03-1999 26-05-1993 07-12-1993 02-07-1996 23-09-1997 06-04-1998
US 5474796 A	12-12-1995	AT 156034 T CA 2163781 A DE 69404657 D DE 69404657 T EP 0703825 A JP 9500568 T WO 9427719 A	15-08-1997 08-12-1994 04-09-1997 18-12-1997 03-04-1996 21-01-1997 08-12-1994
WO 9628538 A	19-09-1996	AU 5420596 A BR 9607193 A CA 2213854 A CN 1186513 A CZ 9702844 A EP 0821726 A HU 9801679 A JP 11502617 T	02-10-1996 11-11-1997 19-09-1996 01-07-1998 14-10-1998 04-02-1998 28-10-1998 02-03-1999
EP 0402917 A	19-12-1990	US 5156810 A AT 145064 T CA 2019039 A DE 69029060 D DE 69029060 T JP 2874964 B JP 3128449 A US 5427915 A US 5491097 A US 5622872 A US 5571568 A US 5268305 A	20-10-1992 15-11-1996 15-12-1990 12-12-1996 30-04-1997 24-03-1999 31-05-1991 27-06-1995 13-02-1996 22-04-1997 05-11-1996 07-12-1993

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03437

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N27/327 G01N33/543 C12Q1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ³	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 653 939 A (KOSICKI BERNARD B ET AL) 5. August 1997 siehe Spalte 2 - Spalte 4 ----	1,25
X	US 5 474 796 A (BRENNAN THOMAS M) 12. Dezember 1995 siehe Beispiele 1-3 ----	1,25
X	WO 96 28538 A (MESO SCALE TECHNOLOGIES LLC) 19. September 1996 siehe Beispiele ----	1,25
A	EP 0 402 917 A (BIOCIRCUITS CORP) 19. Dezember 1990 siehe Beispiele -----	1,25



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"S" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. April 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/05/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/DE 98/03437

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5653939 A	05-08-1997	US 5846708 A	08-12-1998
		EP 0638173 A	15-02-1995
		JP 7508831 T	28-09-1995
		WO 9322678 A	11-11-1993
		AT 176324 T	15-02-1999
		DE 69228291 D	11-03-1999
		EP 0543550 A	26-05-1993
		JP 5322817 A	07-12-1993
		US 5532128 A	02-07-1996
		US 5670322 A	23-09-1997
		US 5891630 A	06-04-1998
US 5474796 A	12-12-1995	AT 156034 T	15-08-1997
		CA 2163781 A	08-12-1994
		DE 69404657 D	04-09-1997
		DE 69404657 T	18-12-1997
		EP 0703825 A	03-04-1996
		JP 9500568 T	21-01-1997
		WO 9427719 A	08-12-1994
WO 9628538 A	19-09-1996	AU 5420596 A	02-10-1996
		BR 9607193 A	11-11-1997
		CA 2213854 A	19-09-1996
		CN 1186513 A	01-07-1998
		CZ 9702844 A	14-10-1998
		EP 0821726 A	04-02-1998
		HU 9801679 A	28-10-1998
		JP 11502617 T	02-03-1999
EP 0402917 A	19-12-1990	US 5156810 A	20-10-1992
		AT 145064 T	15-11-1996
		CA 2019039 A	15-12-1990
		DE 69029060 D	12-12-1996
		DE 69029060 T	30-04-1997
		JP 2874964 B	24-03-1999
		JP 3128449 A	31-05-1991
		US 5427915 A	27-06-1995
		US 5491097 A	13-02-1996
		US 5622872 A	22-04-1997
		US 5571568 A	05-11-1996
		US 5268305 A	07-12-1993